

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
Studij medicine

Tea Ivanković

GENETIČKI UZROCI INFERTILITETA
U ISTOČNOJ SLAVONIJI

Diplomski rad

Osijek, 2016.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
Studij medicine

Tea Ivanković

GENETIČKI UZROCI INFERTILITETA
U ISTOČNOJ SLAVONIJI

Diplomski rad

Osijek, 2016.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za medicinsku genetiku, na Katedri za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasenka Wagner

Rad ima 36 listova i 12 tablica.

PREDGOVOR

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Jasenki Wagner na puno strpljenja i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Puno hvala mojoj obitelji, na financijskoj i moralnoj podršci.

Posebno hvala Tini, Ani i Damiru na razumijevanju, strpljivosti i ugodnim ometanjima u radu.

SADRŽAJ

I. POPIS KRATICA:	II
1. UVOD	1
1.1. Terminologija i definicija	1
1.2. Prevalencija	1
1.3. Dijagnostička obrada infertilnog para	2
1.3.1. Muški partner.....	2
1.3.2. Ženska partnerica	4
1.4. Uzroci infertilnosti	5
1.5. Genetički uzroci infertilnosti	5
1.5.1. Genetički uzroci infertilnosti kod muškaraca	7
1.5.2. Genetički uzroci infertilnosti kod žena	8
2. CILJEVI RADA	10
3. ISPITANICI I METODE	11
3.1. Ustroj studije	11
3.2. Ispitanici	11
3.3. Metode	11
3.4. Statističke metode	12
4. REZULTATI	13
5. RASPRAVA	21
6. ZAKLJUČAK	25
7. SAŽETAK	26
8. SUMMARY	27
9. LITERATURA	28
10. ŽIVOTOPIS	36

I. Popis kratica:

FSH – hormon koji stimulira folikule

LH – luteinizirajući hormon

UZV – ultrazvuk / ehosonografija

ART – tehnike medicinski potpomognute oplodnje (engl. *Assisted Reproductive Technology*)

AZF – faktor azoospermije (engl. *azoospermia factor*)

CFTR – prema engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

CBAVD – kongenitalni bilateralni nedostatak *vas deferensa* (engl. *congenital bilateral absence of the vas deferens*)

PRL – prolaktin

E2 – estradiol

PCOS – sindrom policističnih jajnika (engl. *polycystic ovary syndrome*)

MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza

PAI-1 – inhibitor aktivatora plazminogena (engl. *plasminogen activator inhibitor-1*)

FVL – faktor V Leiden

PT – protrombin

GnRH – hormon koji oslobađa gonadotropine (engl. *gonadotropin-releasing hormone*)

SRY – regija koja određuje spol (engl. *sex determining region Y*)

TESE – mikrokirurška testikularna ekstrakcija spermija (engl. *testicular sperm extraction*)

POF – primarno ovarijsko zatajenje (engl. *primary ovarian failure*)

PGD – preimplantacijska genetička dijagnoza

IVF – *in-vitro* oplodnja

SCOS – sindrom Sertolijevih stanica (engl. *Sertoli cell only syndrome*)

KS – Kallmanov sindrom

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

KBC – Klinički bolnički centar

1. UVOD

1.1. Terminologija i definicija

U literaturi i raznim studijama postoji velika raznolikost i neujednačenost definicija infertiliteta te drugih pojmova koji obilježavaju ista ili slična stanja, kao što su sterilitet, primarni i sekundarni infertilitet, subfertilnost. Klinička, demografska i epidemiološka definicija infertiliteta različita je. Dok demografska i epidemiološka istraživanja promatraju stanje infertiliteta na razini populacije, klinička promatraju pojedinca. Epidemiološka istraživanja definiraju infertilitet kao stanje svake žene u dobi 15 – 49 godina koja ne koristi kontracepciju, seksualno je aktivna te nije trudna, a nije ostvarila trudnoću tijekom 2 godine ili duže (1), dok demografska neplodnim smatraju ženu u dobi 15 – 49 koja je spolno aktivna, ne koristi kontracepciju, a nije ostvarila rođenje živog djeteta 5 godina (2). Infertilitet se prema kliničkim smjernicama definira kao bolest ili stanje reproduktivnog sustava koje rezultira izostankom spontanog začeća unutar godinu dana, ili više, uz redovite spolne odnose bez korištenja kontracepcije (3, 4). Redoviti spolni odnosi podrazumijevaju odnos svaka 2 – 3 dana između menstruacija (5). U našem se jeziku pojam neplodnosti još uvijek izjednačava s pojmom steriliteta (6). Primarna infertilnost stanje je žene kod koje nikada nije došlo do spontanog začeća ili koja nikada nije iznijela trudnoću do kraja. Sekundarna infertilnost stanje je žene koja ne može spontano postići trudnoću ili je iznijeti do kraja, a u prošlosti je postignuto spontano začeće ili rođenje živog djeteta (3). Subfertilitet je pojam koji označava stanje problematičnog fertiliteta te produženo vrijeme potrebno do postizanja spontane koncepcije. U usporedbi pojma steriliteta i infertiliteta, oni mogu biti sinonimi ili se infertilitet definira kao sterilitet sa sporadičnom mogućnošću spontanog začeća (7). Rekurentnim spontanim pobačajima smatraju se 3 ili više uzastopna spontana pobačaja do 20 tjedna (8).

1.2. Prevalencija

Prevalencija infertilnosti varira u različitim studijama i populacijama te se kreće od 0,6 % do 32 %, ovisno o korištenoj definiciji i ustroju studije (1, 3, 9, 10). Studija provedena u Velikoj Britaniji pokazala je da se postotak infertilnih parova kreće između 8 i 20 %, a da će svaki sedmi par imati nekakve probleme koji ometaju ostvarivanje začeća (9). Pojavnost primarne infertilnosti varira 0,6 – 3,4 %, a sekundarne infertilnosti 8,7 – 32,6 % (1). Istraživanje provedeno u zemljama u razvoju zabilježilo je nešto višu prevalenciju primarne infertilnosti: 1,2 – 17,8 %, dok je sekundarna infertilnost bilježila porast s porastom dobi žena pa je iznosila 5 % u skupini žena dobi 20 – 24 godine i čak 62 % u skupini žena u dobi 45 - 49

godina (3). Zanimljivi su rezultati studije koja je koristila više različitih definicija infertilnosti te za svaku zabilježila različitu prevalenciju, pa je tako korištenjem definicije koja infertilnošću smatra nepostizanje trudnoće u 2 godine nezaštićenih spolnih odnosa dobivena prevalencija 12,1 %. Korištenjem druge definicije, koja infertilnost definira kao nepostizanje trudnoće u 2 godine nezaštićenih odnosa, ali uz svjesno pokušavanje para, dobivena je prevalencija 6,9 % (10). I Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) definira primarnu sterilnost kao stanje u kojem ne dolazi do trudnoće unatoč izloženosti riziku trudnoće i želji za potomstvom (11). 80 – 90 % fertilnih parova ostvarit će začeće u prvoj godini, još 5 % zanijet će u sljedećih 12 mjeseci, dok je poslije 48 mjeseci ostatak parova zasigurno infertilno, a mogućnost za spontano začeće i živorođeno dijete blizu je 0 % (7, 12, 5, 13). Muški uzrok infertiliteta nalazi se kod 20 – 50 % neplodnih parova, ženski u 50 % slučajeva, združeni u 30 – 40 %, a nepoznati u 10 – 28 % (11, 14, 15, 28, 30). Oko 1 % žena ima 3 ili više spontanih abortusa, a čak 5 % 2 ili više (17).

1.3. Dijagnostička obrada infertilnog para

Potrebno je javiti se liječniku nakon godine dana redovitih spolnih odnosa bez korištenja kontracepcije i odsutnosti trudnoće ili nakon 2 ili više spontanih pobačaja. Dijagnostička obrada poslije samo 6 mjeseci nezaštićenih odnosa preporuča se ako je partnerica dobi više od 35 godina ili ako postoji dodatno stanje kod bilo kojeg partnera za koje se zna da bi moglo ometati normalno fertilno stanje (12). U evaluaciji infertiliteta cilj je prepoznati stanja koja se mogu ispraviti, utvrditi postojanje ili odsutnost genetičkog uzroka infertilnosti kako bi se par mogao savjetovati o mogućnosti prenošenja mutacije na potomstvo te identificirati stanja koja pridonose infertilitetu, ali mogu ugroziti život pacijenta i treba ih se hitno liječiti (18).

1.3.1. Muški partner

Svaka dijagnostička obrada počinje uzimanjem anamneze. Tako se mogu saznati brojne informacije koje mogu usmjeriti na daljnje postupke. Uzimanje nekih lijekova može utjecati na kvalitetu i proizvodnju spermija. To su, na primjer, antiepileptici, citostatici, imunosupresivi te lijekovi koji utječu na endokrini sustav: spironolakton, ketokonazol, anabolički steroidi. Učinci lijekova obično su reverzibilni. Važne su i informacije o početku i napredovanju puberteta, erektilnoj funkciji, prošlim infekcijama urogenitalnog sustava te postojećim kroničnim bolestima (12). Anamnezu će upotpuniti klinički pregled. Njime se mogu uočiti opće karakteristike koje upućuju na izostao ili nepravilan razvitak sekundarnih spolnih oznaka. Kliničkim pregledom vanjskih spolnih organa može se uočiti hipospadija ili

epispadija, odrediti volumen i konzistencija testisa, a palpacijom *vas deferensa* njegova ageneza ili opstrukcija (15).

Spermiogramom se mjeri više parametara koji određuju kvalitetu spermija (12). Ako su vrijednosti spermiograma abnormalne, upućuju na nižu šansu spontanog ostvarivanja trudnoće. Jedan ciklus spermatogeneze traje oko 60 dana pa se nalaz treba ponoviti nakon 2 mjeseca ili više. Morfologija spermija mogla bi imati najbolju diskriminacijsku ulogu u identifikaciji infertilnih muškaraca. Postejakulatorni test urina na prisutnost spermija može razlučiti retrogradnu ejakulaciju od opstruktivne ili neopstruktivne azoospermije (15). Bakteriološka kultura ejakulata ne preporučuje se rutinski jer će kod čak 83 % muškaraca ona biti pozitivna (15). Međutim, adhezija ili aglutinacija mikroorganizama može uzrokovati smanjen motilitet spermija i interferirati s interakcijom oocite i spermija. Značajnim se smatra više od 10³ patogenih bakterija / ml ejakulata. Prisutnost leukocita u ejakulatu mogla bi uzrokovati oštećenje stanične membrane spermija ili oksidativno oštećenje DNA zbog produkcije citokina i kisikovih radikala (19). Kod abnormalnog nalaza spermiograma ili drugih entiteta koji upućuju na endokrinopatiju određuje se hormonski profil. On uključuje serumske razine testosterona, hormona koji stimulira folikule (FSH), luteinizirajućeg hormona (LH), inhibina B i prolaktina (PRL). Prognostički je važan omjer razine inhibina B i FSH. Što je omjer manji to je manja vjerojatnost dobre testikularne funkcije. Od slikovnih metoda koristi se ultrazvuk (UZV) i transrektalni UZV. Transrektalnim UZV-om provjerava se izgled prostate i ejakulatornog trakta (12).

Test antispermalnih antitijela provodi se kod izolirane asthenozoospermije, kod prisutnosti rizika autoimunog oštećenja; anamnestički podatak torzije ili traume testisa te kod infertiliteta sa svim normalnim nalazima rutinskih pretraga. Smatra se da takva antitijela vezana za glavu spermija ometaju interakciju s oocitom, a ona vezana za rep smanjuju motilitet. Značajnim se smatra nalaz više od 50 % spermija vezanih za antitijela (15).

Kariotipizacija se preporučuje muškarcima s brojem spermija u ejakulatu manjim od 10 milijuna, kod ponavljanih spontanih pobačaja, sumnje na Klinefelterov sindrom te prije tehnika medicinski potpomognute oplodnje (ART-a) (20, 12, 21). Naime, kromosomske su aberacije 10 puta učestalije u infertilnoj nego u općoj populaciji (20). Analiza mikrolelecija u azoospermija faktor (*AZF*) regiji Y kromosoma provode se kod svih pacijenata s oligozoospermijom ili azoospermijom te prije ART-a (12) jer takve mikrolelecije obavezno nasljeđuje muški potomak (20). Kod muškaraca s opstruktivnom azoospermijom potrebno je posumnjati na mutacije *CFTR* (engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), osobito kod kongenitalnog bilateralnog nedostatka *vas deferensa* (CBAVD-a) (20).

1.3.2. Ženska partnerica

Kao i kod muškog partnera, anamnestički podatci mogu ukazati na uzrok infertiliteta. Neuredni menstrualni ciklusi, posebice amenoreja ili oligomenoreja, upućuju na anovulatorne cikluse. Povijest preboljenih upalnih bolesti u maloj zdjelici, salpingitisa ili prethodne ekstrauterine trudnoće tubarni su faktori koji bitno doprinose problemu prijenosa i implantacije zametka. Ponavljani spontani abortusi mogli bi značiti postojanje patoloških kongenitalnih ili funkcionalnih anomalija maternice. Rutinski postupci uključuju ginekološki pregled, test po Papanicolaou te uzimanje briseva vrata maternice za mikrobiološku analizu (5). Osim kompletne krvne slike i koagulograma, u laboratorijskoj obradi određuju se i razine hormona. 2. – 5. dan ciklusa određuju se serumske razine FSH-a, LH-a, estradiola (E2), PRL-a i tireostimulirajućeg hormona, a 21. dan razina progesterona. Visok FSH ukazuje na slabu funkciju jajnika i mali broj preostalih jajnih stanica. Povišen PRL može upućivati na tumor hipofize (5). Razina progesterona u serumu 21. dan iznad 15,9 nmol / l sugerira ovulacijski ciklus. Suprotno, niska razina progesterona znači ovulatornu disfunkciju. Visoka razina FSH-a (više od 30 mIU / ml) s niskom razinom estradiola upućuje na nedostatnu ovarijsku funkciju (5, 13). Niska razina FSH-a i posljedično estradiola znači disfunkciju hipotalamusa ili hipofize, dok se kod uredne razine obaju hormona, FSH-a i E2, s disfunkcijom ovarija, smatra da se radi o poremećaju ravnoteže između hipofize i ovarija, a u 80 % slučajeva radi se o sindromu policističnih jajnika, PCOS-u (22).

Testovi za procjenu ovarijske rezerve mogu biti biokemijski i ultrazvučni. Bazalni biokemijski testovi koriste razinu FSH-a, estradiola ili anti-Müllerovog hormona. Test klomifen-citratom provokacijski je biokemijski test. Ultrazvučno se procjenjuje volumen ovarija i broj antralnih folikula (AFC). Koristi se transvaginalni UZV u ranoj folikularnoj fazi ciklusa (13, 23). AMH ili anti-Müllerov hormon se pokazao kao vrlo dobar kvantitativan pokazatelj ovarijske rezerve, superioran drugim korištenim markerima (24). Evaluacija cervikalne sluzi i postkoitalni test cervikalne sluzi danas se smatraju nepouzdanima i opsolentnima (13).

Transvaginalnim UZV-om promatra se izgled endometrija u prvoj i drugoj fazi ciklusa i procjenjuje mogućnost implantacije zametka. Moguće je uočiti uterinu i adneksalnu patologiju, tumorske tvorbe u maloj zdjelici. Hiperehogena stroma s brojnim perifernim folikulima izgled je policističnih jajnika, a PCOS je vrlo čest uzrok infertiliteta i hiperstimulacijskog sindroma kod pokušaja indukcije ovulacije. Funkcionalne ciste jajnika mogu ometati ovulaciju. Endometriotična žarišta mogu se prikazati kao ehogene cistične tvorbe (5). Ako se sumnja na tubarni uzrok infertiliteta, ispituje se prohodnost jajovoda.

Minimalno invazivna histerosalpingografija preporučuje se ženama koje nemaju rizičnih čimbenika za tubarnu opstrukciju, dok se za žene s anamnestičkim podacima o infekciji, endometriozi ili ekstrauterinim trudnoćama koriste histeroskopija ili laparoskopija (13).

Izrada kariograma preporučuje se ženama s ponavljanim spontanim pobačajima, induciranim pobačajima zbog otkrivene patologije ploda, majkama mrtvorođene ili živorođene djece s malformacijom, prije postupaka medicinski potpomognute oplodnje (21) te visokih razina FSH-a ili LH-a (3). Testovi mutacija gena za metilentetrahidrofolat reduktazu (*MTHFR*), inhibitor aktivatora plazminogena (*PAI-1*), faktor V Leiden (*FVL*) i protrombin (*PT*) mogu se provoditi kod pojave rekurentnih pobačaja, pogotovo kasnih (25). Mutacije *FMRI* gena, odnosno broj CGG ponavljanja provode se kod žena koje u obitelji imaju članove oboljele od sindroma fragilnog X kromosoma ili ovarijsku insuficijenciju u mlađoj dobi. Premutacije ovog gena, ponavljanja od 55 – 200 CGG tripleta nalaze se kod 3 – 15 % žena s preuranjenim ovarijskim zatajenjem (POF-om) (26, 27).

1.4. Uzroci infertiliteta

Infertilitet je rezultat anatomskih, endokrinoloških, fizioloških ili združenih nepravilnosti. Kod muškog partnera potrebna je uspješna i pravilna maturacija spermija, uredan prijenos ejakulata, uredna funkcija akcesornih žlijezda te pravilna erektilna i ejakulatorna funkcija. Kod žene je potrebna ovulacija zdrave jajne stanice, dobra prohodnost i motilitet jajovoda, zadovoljavajuć endometrijski i anatomija maternice koji su spremni za implantaciju zametka te odgovarajuća cervikalna sluz (5). Uzroci ili čimbenici rizika koji pridonose infertilitetu mogu biti hormonski poremećaji, pretilost, pretjerana fizička aktivnost, izloženost raznim toksinima i lijekovima, infekcije te imunološki, iatrogeni ili psihološki faktori. Može se reći da većina navedenih uzroka ili čimbenika rizika može imati genetičku pozadinu, na primjer, čak i sklonost infekcijama može biti genetski uvjetovana, iako u maloj mjeri (28).

1.5. Genetički uzroci infertiliteta

Genetički uzroci infertiliteta mogu biti numeričke i strukturne kromosomske aberacije koje mogu zahvaćati autosomne i spolne kromosome, monogenski i poligeni poremećaji te epigenetske abnormalnosti (29).

Downov sindrom zahvaća oba spola, muškarci su obično neplodni, iako je zabilježeno nekoliko slučajeva spontanog postizanja očinstva. Žene mogu biti fertilne ili subfertilne, obično postoji smanjen broj folikula u ovarijima, a kod onih koje zatrudne češće su spontani pobačaji te potomstvo s malformacijama (30).

Kallmannov sindrom (KS) uzrokuje poremećaj u migraciji neurona koji proizvode hormon koji oslobađa gonadotropine (GnRH), zbog toga dolazi do smanjene razine GnRH-a i posljedično LH-a i FSH-a (31, 32). Veći broj gena povezuje se s KS-om: *KALI*, *FEZF1*, *SOX10*... KS se može nasljeđivati X-vezano recesivno, autosomno recesivno i autosomno dominantno (32).

Kromosomske translokacije češće se nalaze kod infertilnih nego kod fertilnih parova – nalaze se kod 20 % infertilnih (33), a samo kod 0,19 % opće populacije (34). One mogu zahvaćati autosomne ili spolne kromosome (20).

Translokacije koje uključuju X kromosom obično dovode do multiplih kongenitalnih anomalija ili mentalnom retardacijom te POF-om. Objavljen je slučaj žene s kariotipom 46,X, t(X:1) koja je bila fenotipski normalna, s iznimkom amenoreje (33).

Robertsonova je translokacija 9 puta češća kod infertilnih nego kod fertilnih muškaraca (35). Nositelji balansiranih kromosomskih translokacija fenotipski su normalni, s iznimkom učestalije subfertilnosti nego u općoj populaciji. Kod nositelja Robertsonove translokacije translocirani kromosomi sa svojim normalnim homolognim kromosomima u prvoj mejotičkoj diobi tvore trivalent, a kod nositelja recipročne translokacije sličnim mehanizmom nastaje kvadrivalent (36). Takve strukture u anafazi segregiraju na razne načine, a samo su neke gamete koje time nastaju balansiraniog kariotipa (35). Kod nositelja balansirane translokacije, Robertsonove ili recipročne, nađena je uvjerljivo viša učestalost pojavljivanja aneuploidnih, disomičnih i diploidnih spermija. Također je veći rizik začeća abnormalnog embrija, što uzrokuje neuspješnu implantaciju, rane abortuse ili potomstvo s malformacijom (36, 37). U jednom istraživanju, 5,9 % muških nositelja imalo je azoospermiju, 43,1 % oligozoospermiju, a čak 51 % normozoospermiju (38). Posljedice balansirane translokacije ovise o uključenim kromosomima, veličini translociranog segmenta, mjestu prekida kromosoma. Utječu na segregaciju kromosoma u mejozi i količinu nebalansiranih gameta, a povećavaju i učestalost aberacija kromosoma koji nisu uključeni u translokaciju zbog interkromosomskog efekta (36, 39). Translokacije mogu poremetiti funkciju gena koji se nalaze na mjestu loma kromosoma, na primjer, gena za spermatogenezu (38). Kod nositelja translokacije preporučuje se preimplantacijska genetička dijagnostika (PGD) jer smanjuje vrijeme do rođenja zdravog djeteta nekoliko mjeseci (34).

Mutacije gonadotropnih hormona i gonadotropnih receptora rijetke su. Aktivirajuće mutacije očituju se i kod heterozigota, dok se inaktivirajuće fenotipski očituju samo kod homozigota i složenih heterozigota. Inaktivirajuće mutacije gena za FSH-receptor mogu ometati vezanje hormona ili transdukciju signala. Uzrokuju ovarijsku disgenezu i

hipergonadotropni hipogonadizam. Kod mutacija gena za podjedinice FSH-a, muškarci se većinom normalno razvijaju do puberteta i tijekom puberteta, ali imaju smanjen broj spermija u ejakulatu. Žene su, naprotiv, bez spolnih oznaka i infertilne, folikuli se razvijaju samo do rane antralne faze (40). LH uvjetuje produkciju androgena u *theca* stanicama jajnika i Leydigovim stanicama testisa. Fenotip postoji samo kod homozigota i složenih heterozigota. Aktivirajuće mutacije kod dječaka uzrokuju prerani pubertet, kod žena nema kliničke slike. Inaktivirajuće mutacije kod dječaka uzrokuju pseudohermafroditizam, kod djevojčica amenoreju i anovulacijske cikluse, što je uzrok infertilnosti, ali postoje sekundarne spolne oznake (41).

1.5.1. Genetički uzroci infertilnosti kod muškaraca

U populaciji infertilnih muškaraca, 3 – 19 % ima određenu kromosomsku abnormalnost. U studijama je pronađena korelacija između smanjenog broja spermija i veće prevalencije kromosomskih abnormalnosti, ali takva povezanost nije pronađena s motilnošću ili morfologijom spermija. Aberacije koje zahvaćaju spolne kromosome najčešće se nalaze kod azoospermičnih muškaraca, dok se autosomne abnormalnosti češće očituju kao oligozoospermija ili čak normozoospermija (42).

Klinefelterov je sindrom aneuploidija koja zahvaća spolne kromosome. Procjenjuje se da je samo 25 % muškaraca dijagnosticirano kroz svoj cijeli životni vijek, a samo 10 % do puberteta (43, 44). Kariotip je obično 47,XXY, u 80 % slučajeva. U ostalih 20 % najviše su zastupljeni mozaici 47,XXY / 46,XY, a sasvim rijetko moguća je pojava više od 2 X kromosoma (48,XXXY), ili više Y kromosoma (48,XXYY). Ta aneuploidija u većini slučajeva rezultat je nerazdvajanja kromosoma u majčinoj oogenezi, u trećini slučajeva u spermatogenezi. Histološkom analizom testisa nalazi se hijalina fibroza koja zahvaća većinu seminifernih kanalića i tek fokalno nekoliko središta aktivne spermatogeneze (43, 44). Pacijenti ne moraju imati prepoznatljivu i očitu kliničku sliku, ali obično imaju manji volumen testisa (20). Proces degeneracije spolnih stanica počinje već kod fetusa, nastavlja se sve do puberteta, s eksponencijalnim nestajanjem te do puberteta obično ne preostaje više od nekoliko stanica. Spermatogonije ili spermatocyte ne ulaze u mejozu u vrijeme puberteta već odumiru apoptozom. Tek kod 50 % dječaka predpubertalne dobi nađeno je nešto spermija u ejakulatu (45). Kod 90 % pacijenata s Klinefelterovim sindromom nalazi se azoospermija, a tek kod 8,4 % nađeno je nešto spermija, međutim poremećeni su i motilnost i morfologija (46, 44, 45).

Rijetka je pojava muškaraca s kariotipom 46,XX. Kod njih dolazi do translokacije dijela Y kromosoma na kojem se nalazi regija koja određuje spol (*SRY* regija, engl. *sex determining region Y*), a nedostaju *AZFa*, *AZFb* i *AZFc* regije, zbog čega su infertilni. Drugi mehanizmi mogu biti prstenasti Y ili izocentrični Y kromosom (20).

Sličan je slučaj infertilnog muškarca s kariotipom 45,X. Osobe takvog kariotipa obično fenotipski nalikuju ženama, međutim, kod ovog pacijenta kratki krak Y kromosoma uključujući *SRY* regiju, nalazio se na 13. kromosomu, kao nebalansirana translokacija. Infertilnost je u ovom slučaju rezultat gubitka dugog kraka Y kromosoma na kojem se nalaze geni važni za spermatogenezu (47).

Mikrodelecije Y kromosoma češće su kod muškaraca s azoospermijom i oligozoospermijom. One zahvaćaju dugi krak Y kromosoma i većinom su nastale *de novo*. Na dugom kraku Y kromosoma nalazi se *AZF* regija, koja se dijeli na, od proksimalno prema distalno, *AZFa*, *AZFb*, *AZFc* regiju. U području *AZFa* regije nalaze se *DFFRY*, *DBY*, *AZFaT1*, i *UTY* geni. Delecija samo *DFFRY* i *AZFaT1* dovodi do oligozoospermije, a s gubitkom i *DBY* gena kod pacijenta se nalazi sindrom Sertolijevih stanica (SCOS) te kod muškaraca s delecijom te regije obično nema spermatogenezu. Delecija *AZFb* regije dovodi do gubitka *RBMY1* gena, dolazi do aresta spermatogenezu na razini primarne spermatocyte, ne nalaze se zreli spermiji. Delecije *AZFc* regije najčešće su i najraznolikije. Može se raditi o subdelecijama ili potpunim delecijama. Najčešće se gubi *DAZ* gen (20, 28). Kod 70 % pacijenata s *AZFc* delecijama moguća je mikrokirurška testikularna ekstrakcija spermija (TESE, engl. *testicular sperm extraction*), iako to ovisi o tipu delecije i zahvaćenosti regije. Kod delecija s *AZFa* i *AZFb* delecijama u većini slučajeva ekstrakcija nije moguća. Sve te delecije, tehnikama medicinski potpomognute oplodnje, prenose se na potomstvo (15).

Stanje nositelja *CFTR* mutacije povezano je s infertilnošću u muškaraca. Naime, 80 % muškaraca s CBAVD-om nositelji su *CFTR* mutacije (15), a kod muškaraca s kongenitalnim unilateralnim nedostatkom *vas deferens* 24 % će biti nositelji *CFTR* mutacije (20).

1.5.2. Genetički uzroci infertilnosti kod žena

Turnerov sindrom (45,X) zahvaća 1 : 2500 živorođene djece. U 49 % slučajeva radi se o kompletnom nepostojanju drugog X, u oko 20 % slučajeva radi se o mozaičnoj formi: 46,XX / 45,X. Ostali slučajevi uključuju izokromosom dugog kraka X kromosoma, prstenasti X kromosom ili parcijalni gubitak X kromosoma (48). Folikularnom apoptozom broj oocita bitno se smanjuje već do sredine intrauterinog života zahvaćene djevojčice te u ranom djetinjstvu zaostaje samo još nekoliko ovarijskih folikula. Kod mozaika postoji veći broj

oocita te one mogu imati menarhu i sekundarne spolne oznake, međutim brže dolazi do POF-a (49). Kod pravog Turner sindroma, samo 5 – 10 % djevojčica ima menstrualne cikluse. Mozaici koji ostvare trudnoću mogu imati rekurentne pobačaje, neuspjele *in-vitro* oplodnje (IVF-e) ili potomstvo s malformacijom (48).

Trisomija X; 47,XXX, numerička je anomalija spolnih kromosoma. Nastaje zbog nerazdvajanja kromosoma u mejozi, a do kliničke slike dolazi zbog ekspresije gena na X kromosomu koji su normalno inaktivirani. Fenotip je izrazito varijabilan. Dolazi do insuficijentnog rada ovarija, zatajenja razvoja folikula i brže pojave menopauze (50).

Žene s kariotipom 46,XY neosjetljive su na androgene. Osjetljivost može biti parcijalna ili kompletna. Kod parcijalne su češće mutacije 5alfa-reduktaze-2 (SRD5A2), kod njih u pubertetu može doći do virilizacije. Kod kompletne neosjetljivosti na androgene češće su mutacije AR-a (gena za androgeni receptor), obično ni u pubertetu nema virilizacije, a zbog nedostatka ovarija i uterusa, takve su žene infertilne (51).

FMRI gen povezan je s POF-om kod žena s premutacijskim brojem ponavljanja CGG tripleta: 55 – 200. Učestalost POF-a kod nositeljica premutacije iznosi 13 – 26 % (52). Žene s intermedijarnim brojem ponavljanja CGG tripleta; 45 – 55, vjerojatno neće imati muške potomke sa sindromom fragilnog X, ali mogu imati ženske potomke s POF-om (27).

Polimorfizmi gena povezanih s koagulacijskim faktorima povezani su s pojavom tromboze, rekurentnim pobačajima, smrti fetusa i intrauterinog zastoja u rastu. Međutim, rezultati i zaključci studija razlikuju se, kao i mišljenja o povezanosti s navedenim stanjima (8, 17, 25, 53, 54, 55). Mutacija gena za FVL uzrokuje proizvodnju faktora Va kojeg aktivirani protein C ne može razgraditi. Procjenjuje se da je rizik za trombozu oko 3 puta veći čak i kod heterozigota (8). Nositelji mutacije *PT* gena imaju 2 – 8 puta veći rizik od tromboze. Tek kod udružene mutacije *FVL*-a i *PT* gena dolazi do 20 puta većeg rizika za trombozu. U prospektivnim studijama nositelji mutacija *MTHFR*, *FVL* i *PT* gena imali su veći rizik spontanih pobačaja (17). *MTHFR* gen kodira enzim zadužen za metabolizam homocisteina. Homozigoti i složeni heterozigoti imaju veću pojavnost spontanih pobačaja i to u srednjem i kasnom dijelu trudnoće (25). PAI-1 važan je faktor fibrinolize. Pojava 4G polimorfizma u genotipu povezana je s produkcijom proteina veće aktivnosti od onog kodiranog 5G alelom. Homozigoti za 4G alel imaju više serumske razine PAI-1 (56). Nositelji 4G / 4G genotipa bili su zastupljeniji u grupi ispitanika s rekurentnim pobačajima nego u kontrolnoj skupini (53). I kod nositelja 4G / 5G genotipa nađene su više razine PAI-1 u serumu (55), a jedno istraživanje takav je genotip povezalo s rekurentnim pobačajima samo kod bjelačke populacije, ali ne i kod azijske (54, 57).

2. CILJEVI RADA

Ciljevi ovog rada su:

1. uvidom u arhivu utvrditi broj infertilnih parova koji su se u desetogodišnjem razdoblju javili u Genetičko savjetovalište Kliničkog bolničkog centra (KBC-a) Osijek i zatim bili obrađeni u Laboratoriju za medicinsku genetiku.
2. odrediti omjer svih registriranih u savjetovalištu prema onima koji su dalje poslani na kariotipizaciju.
3. odrediti postotak parova kod kojih je dokazan genetički uzrok infertiliteta.
4. odrediti pojavnost pojedinih genetičkih entiteta ovisno o spolu partnera u ukupnom broju parova s genetičkim uzrokom infertiliteta.
5. usporediti dobivene rezultate s drugim nacionalnim studijama ili zemljama iz okruženja.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno kao retrospektivno (58).

3.2. Ispitanici

Uzorak ispitanika sastoji se od parova obrađenih i liječenih zbog infertiliteta u Genetičkom savjetovalištu KBC-a Osijek, Ambulanti za humanu reprodukciju Klinike za ginekologiju i opstetriciju KBC-a Osijek i Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Osijek u desetogodišnjem razdoblju 2006. – 2016. godine.

Istraživanjem su obuhvaćeni parovi pod uputnom dijagnozom: *infertilitas*, *infertilitas primaria*, *infertilitas feminae*, *infertilitas musculinae*, *infertilitas secundaria*, *azoospermia*, *hypofunctio testicularis*, *abortus habitus*, genetičko savjetovništvo.

Pacijenti s drugim dijagnozama: *myoma uteri*, *amenorrhea*, menopauza, *leiomyoma uteri*, cista žutog tijela, roditelj djeteta s malformacijom ili nadzor nad trudnoćom druge etiologije, a kojima je infertilitet bio sekundarna dijagnoza ili se u dokumentaciji uopće ne pojavljuje te zbog iste nisu obrađivani niti liječeni, nisu bili uključeni u ovo istraživanje.

3.3. Metode

Temeljna metoda bio je pregled medicinske dokumentacije parova obrađenih zbog infertiliteta. Parametri koji su se pratili jesu: dob, spol, uputna dijagnoza, mjesto upućivanja pacijenta: Klinika za ginekologiju i opstetriciju, Genetičko savjetovništvo pri Klinici za pedijatriju ili Laboratorij za medicinsku genetiku, broj pobačaja, broj pokušaja IVF-a, nalaz kariograma, nalaz spermiograma, mutacije *MTHFR*, *PAI-1*, *FVL* i *PT*, delecije Y-kromosoma ili *AZF* regija te nalaz patohistološke dijagnoze ploda u slučaju pobačaja.

Koristila se dostupna medicinska dokumentacija i nedostatak nekih od navedenih podataka nije bio isključni kriterij, naprotiv, određen je broj parova ili pacijenata koji su imali nalaze određenih genetičkih i kliničkih testova kao bitan podatak koji pridonosi rezultatima studije, daje informaciju o broju pacijenata koji su podvrgnuti određenoj pretrazi ili je njihov nalaz priložen, odnosno načinu provođenja dijagnostičke obrade neplodnog para.

Iako u Ambulanti za humanu reprodukciju na Klinici za ginekologiju i opstetriciju postoji službena medicinska dokumentacija samo ženskog partnera, u njoj su učestalo navedeni i podatci o muškom partneru, kao što su dob i nalaz spermiograma. Zbog toga i

budući da je infertilnost dijagnoza i stanje para (4), pacijentice su u ovom istraživanju promatrane su kao član infertilnog para.

Kao genetički uzrok infertiliteta uzimala su se sljedeća stanja: numeričke kromosomske aberacije, parcijalne delecije kromosoma, stanje nositelja translokacije, delecija *AZF* regija, homozigot za *MTHFR* mutaciju, genotip 4G / 4G i 4G / 5G za *PAI-1*.

Nalaz kariograma koji je promijenjen, ali nije značajan uključuje pojavu kromosomskih heteromorfizama koji se ne smatraju patološkom pojavom (42). Heterozigotnost za *MTHFR* mutacije ne smatra se rizikom za vensku trombozu pa se ne smatra faktorom koji pridonosi infertilnosti (17).

Iako su mišljenja i rezultati o utjecaju polimorfizama gena za *PAI-1* podijeljena, mnoge studije poduprle su povezanost 4G / 4G i 4G / 5G genotipa s pojavom rekurentnih pobačaja (54, 55, 57, 56) pa su se i u ovom istraživanju smatrali genetičkim faktorom koji pridonosi infertilnosti.

3.4. Statističke metode

Učinjena je deskriptivna statistička obrada. Kategorijski podatci predstavljani su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numeričke varijable testirane su na normalnost Shapiro-Wilkovim testom. U slučaju normalne razdiobe varijable su opisane aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. U slučaju nenormalne raspodjele opisane su medijanom i interkvartilnim rasponom. Za usporedbu normalnih (kategorijskih) varijabli korišten je Fisherov egzaktni test i Pearsonov χ^2 test. Statistička analiza napravljena je korištenjem statističkog programa SPSS (inačica 22.0, IBM Corp., Armonk, NY, SAD) (59).

4. REZULTATI

U istraživanju je ukupno obrađeno 982 para, odnosno 1964 pacijenta, na Klinici za ginekologiju, Klinici za pedijatriju i u Laboratoriju za medicinsku genetiku od 2006. do 2016. godine. Svi pacijenti obrađeni ili liječeni zbog problema fertiliteta uključeni su u istraživanje, poslani pod različitim uputnim dijagnozama (Tablica 1).

Tablica 1. Uputne dijagnoze pacijenata

		Apsolutna frekvencija	Relativna frekvencija (%)
Uputna dijagnoza	Infertilitet	146	8,3
	<i>Serilitas primaria feminae / musculine</i>	1731	88,1
	<i>Sterilitas secundaria</i>	17	0,8
	<i>Abortus habitualis</i>	28	1,4
	Genetičko savjetovalište	30	1,5
	<i>Azoospermia</i>	10	0,5
	<i>Hypofunctio testicularis</i>	2	0,1
	Ukupno	1964	100

Srednja vrijednost (aritmetička sredina) dobi ispitanika je 35,5, sa standardnom devijacijom 5,7.

Iz Ambulante za humanu reprodukciju na Klinici za ginekologiju obrađeno je 857 para, od kojih je 21 par (2,3 %) imao nalaz kariograma. Iz Genetičkog savjetovališta obrađeno je 135 parova, od kojih je 126 parova i jedan muškarac imalo nalaz kariograma (93,7 %). U laboratoriju za medicinsku genetiku nalazi se još 11 parova koji nisu upućeni niti iz Genetičkog savjetovališta, niti iz Ambulante za humanu genetiku. Dokumentacija 21-og para nalazila se na oba odjela, na Klinici za pedijatriju i Klinici za ginekologiju i opstetriciju, a u Laboratoriju za medicinsku genetiku nalazi se njihov nalaz kariotipizacije. Za 275 osoba napravljen je bar jedan genetički test.

Podatak o broju pobačaja postojao je za 415 pacijentica (Tablica 2).

Tablica 2. Broj spontanih pobačaja

		Apsolutna frekvencija	Relativna frekvencija (%)	p*
Broj abortusa	0	289	69,6	< 0,001
	1	49	11,8	
	2	43	10,4	
	3	26	6,3	
	4	3	0,7	
	5	4	1	
	6	1	0,2	
	Ukupno	415	100	

*Shapiro-Wilkov test

Broj pokušaja IVF-a bio je zabilježen za 735 pacijentica (Tablica 3).

Tablica 3. Broj pokušaja IVF-a

		Apsolutna frekvencija	Relativna frekvencija (%)	p†
IVF*	0	418	56,9	< 0,001
	1	200	27,2	
	2	66	9	
	3	27	3,7	
	4	8	1,1	
	5	5	0,7	
	6	2	0,3	
	7	1	0,1	
	8	4	0,5	
	9	2	0,3	
	10	2	0,3	
	Ukupno	735	100	

**in-vitro* fertilizacija

†Shapiro-Wilkov test

Nalaz spermiograma bio je priložen za 262 pacijenta (Tablica 4).

Tablica 4. Nalazi spermiograma

		Apsolutna frekvencija	Relativna frekvencija (%)
Spermiogram*	Normozoospermia (uredan nalaz)	122	46,6
	Asthenozoospermia	61	23,3
	Oligozoospermia	17	6,5
	Oligoasthenozoospermia	32	12,2
	Azoospermia	13	5,0
	Oligoasthenoteratozoospermia	17	6,5
	Ukupno	262	100

Genetički uzrok infertiliteta utvrđen je za 16 parova, odnosno 16 pacijenata (Tablica 5, Tablica 6).

Tablica 5. Genetički uzroci infertiliteta

Spol	Genetički uzrok infertiliteta		Broj pacijenata (%)	
muški	Klinefelterov sindrom		1 (33,3)	
	Delecija kraka Y kromosoma		1 (33,3)	
	Nositelj translokacije	t(6;9)(q24;p22)	1 (33,3)	
	Ukupno		3 (100,0)	
ženski	Turner sindrom		1 (7,7)	
	Nositelj translokacije	t(3;17)(q21;p13.1)	1	2 (15,4)
		t(3;11)(q21.3;q23.3)	1	
	MTHFR homozigot		3 (23,1)	
	MTHFR homozigot + PAI-1 4G/5G		2 (15,4)	
	PAI-1 4G / 4G mutacija		5 (38,4)	
	Ukupno		13 (100,0)	
Ukupno			16	

Tablica 6. Postotak parova s utvrđenim genetičkim uzrokom infertiliteta u odnosu na sveukupan broj obrađenih parova

		Apsolutna frekvencija	Relativna frekvencija (%)
Genetički uzrok infertiliteta	Dokazan	16	1,6
	Nije dokazan	966	98,4
	Ukupno	982	100

Za 275 osoba napravljen je barem 1 genetički test.

Genetički uzrok infertiliteta utvrđen je za 16 od 135 parova iz Genetičkog savjetovališta (11,85 %), odnosno za 16 pacijenata od 275 za koje su provedeni genetički testovi (5,81 %).

Nalaz kariograma imalo je 275 pacijenata, 137 žena i 138 muškaraca, a patološki nalaz kariograma imalo je 6 pacijenata (2,3 %) (Tablica 7). Od 137 žena, 2 su nositeljice balansirane translokacije (1,4 %), a od 138 muškaraca, 1 je nositelj balansirane translokacije (0,7 %).

Tablica 7. Nalaz kariotipizacije

		Apsolutna frekvencija	Relativna frekvencija (%)
Nalaz kariograma	Uredan	265	96,4
	Promijenjen, ali ne smatra se značajnim	4	1,5
	Nositelj translokacije	3	1,1
	Delecija	1	0,4
	Klinefelterov sindrom	1	0,4
	Turnerov sindrom	1	0,4
	Ukupno	275	100

Ni kod jednog para nije nađen uzrok infertiliteta kod oba partnera (Tablica 8).

Tablica 8. Utvrđeni genetički uzroci infertiliteta s obzirom na spol

		Spol			p*
		Ženski	Muški	Ukupno	
Abnormalna pojava	Dokazana	13	3	16	0,012
	Nije dokazana	969	979	1948	
	Ukupno	982	982	1964	

*Pearsonov χ^2 test

Drugi provedeni genetički testovi bili su: analiza delecija Y kromosoma / *AZF* regija, analize mutacija *MTHFR*, *PAI-1*, gena za faktor V Leiden i PT.

Analiza delecija Y kromosoma / *AZF* regija provedena je kod 19 muškaraca. Kod 1 muškarca nađena je terminalna delecija dugog kraka Y kromosoma koja uključuje kompletnu deleciju *AZFb* i *AZFc* regije te parcijalnu deleciju *AZFa* regije (Tablica 9).

Tablica 9. Analize delecija Y kromosoma / *AZF* regija

		Apsolutna frekvencija	Relativna frekvencija (%)
Del Y kromosoma / <i>AZF</i> regija	Terminalna delecija dugog kraka Y kromosoma	1	5,3
	Nema delecije	18	94,7
	Ukupno	19	100

Za 2 od 11 (18,18 %) muškaraca s azoospermijom dokazan je uzrok infertiliteta. (Tablica 10).

Tablica 10. Usporedba nalaza spermiograma i genetičkog uzroka infertiliteta

		Genetički uzrok infertiliteta			p*
		Nije dokazan	Dokazan	Ukupno	
Spermiogram	Nema nalaza	719	1	720	0,004
	Normozoospermia (uredan nalaz)	122	0	122	
	Asthenozoospermia	61	0	61	
	Oligozoospermia	17	0	17	
	Oligoasthenozoospermia	32	0	32	
	Azoospermia	11	2	13	
	Oligoasthenoteratozoospermia	17	0	17	
	Ukupno	979	3	982	

*Fisherov egzaktni test

Analiza mutacija *MTHFR*, *PAI-1*, gena za faktor V Leiden i protrombin provedena je kod 23 pacijentice (Tablica 11, Tablica 12).

Tablica 11. Analiza *MTHFR* mutacija

		Apsolutna frekvencija	Relativna frekvencija (%)
<i>MTHFR</i>	Nema mutacije	9	39,1
	Heterizigot za C667T mut	9	39,1
	Homozigot za C667T mut	5	21,7
	Ukupno	23	100

Tablica 12. Analiza *PAI-1* mutacija

		Apsolutna frekvencija	Relativna frekvencija (%)
<i>PAI-1</i>	Ostali	16	69,6
	4G / 5G polimorfizam	2	8,7
	4G / 4G polimorfizam	5	21,7
	Ukupno	23	100

Kod nijedne pacijentice nije nađena mutacija gena za faktora V Leiden ili protrombinskog gena.

5. RASPRAVA

U ovo istraživanje uključeno je sveukupno 982 para koji su obrađeni u KBC-u Osijek 2006. – 2016. Od njih, 135 parova registrirano je u Genetičkom savjetovalištu pri Klinici za pedijatriju, a 857 para obrađena su u Ambulanti za humanu reprodukciju na Klinici za ginekologiju i opstetriciju KBC-a Osijek.

Cilj istraživanja bio je utvrditi broj parova registriranih u savjetovalištu te omjer registriranih i poslanih na kariotipizaciju, zatim odrediti pojavnost određenog genetskog entiteta i usporediti s rezultatima drugih studija.

Većina pacijenata poslana je pod uputnom dijagnozom *sterilitas primaria feminae / musculinae*. Tek 0,8 % imalo je uputnu dijagnozu *sterilitas secundaria*, iako je zabilježeno 52 (5,2 %) para koji već imaju djecu.

Od 857 para u Ambulanti za humanu reprodukciju, 21 par obrađen je u Laboratoriju za medicinsku genetiku (2,3 %). Od 135 parova na Genetičkom savjetovalištu, 93,7 % poslano je na kariotipizaciju. Dokumentacija 21 para nalazila se i na oba odjela. To upućuje na raznolik i neujednačen pristup obradi i liječenju infertiliteta, kao i neorganizirano upućivanje pacijenata i potrebu za jedinstvenim i dobro definiranim sustavom za obradu neplodnih parova.

U ovom istraživanju 77 (18,6 %) žena imalo je 2 ili više spontanih pobačaja ($p < 0,001$), a 117 (16 %) žena bar 2 IVF pokušaj ($p < 0,001$). Najmanje 62 muškarca (iz dostupnih podataka) imalo je nalaz azoospermije, oligozoospermije ili oligoasthenozoospermije.

Nalaz kariograma imalo je sveukupno 137 žena i 138 muškaraca. Za 19 muškaraca s nalazom azoospermije, oligozoospermije i oligoasthenozoospermije postojao je nalaz mikrodelecija *AZF* regija.

Prema preporukama bi na kariotipizaciju bilo potrebno poslati sve muškarce s koncentracijom spermija u mililitru ejakulata manjom od 5 milijuna, one suspektne na Klinefelterov sindrom, sve žene s rekurentnim pobačajima i sve parove prije primjene tehnika medicinski potpomognute oplodnje (9) te ako su serumske razine FSH-a ili LH-a iznad normalnih (3). Rekurentnim pobačajima smatra se 3 ili više uzastopna spontana pobačaja do 20. tjedna trudnoće, a prema nekima čak 2 ili više (17).

Prema podacima u ovom istraživanju 11 parova ima nalaz kariograma u Laboratoriju za medicinsku genetiku, a nisu poslani iz Genetičkog savjetovališta ili Ambulante za humanu reprodukciju. Pretpostavlja se da su poslani iz privatnih ordinacija, zbog čega nedostaje njihova ostala medicinska dokumentacija.

Bilo bi uputno da se u pojedinom centru ne obavljaju genetički testovi bez sigurnog i profesionalnog genetičkog savjetovanja. Genetičko savjetovanje pomaže pacijentu da razumije dijagnozu, medicinske činjenice, prognozu i opcije za liječenje ili druge mogućnosti ishoda vlastitog stanja. Treba razumjeti kako se određeno stanje nasljeđuje, kako se bolest razvija i koji je rizik ponovnog pojavljivanja u obitelji. Ono treba biti sastavni dio obavljanja bilo kakvog genetičkog testa, a trebao bi ga voditi liječnik subspecijalist medicinske genetike ili liječnik posebno obučen za savjetovanje u specifičnom području (60).

U ovom istraživanju genetički uzrok infertiliteta utvrđen je za 16 od 135 parova iz Genetičkog savjetovišta (11,85 %), odnosno za 16 pacijenata od 275 za koje su provedeni genetički testovi (5,81 %). Od tih 16 pacijenata, 13 (81,3 %) su žene, a 3 (18,7 %) su muškarca ($p = 0,012$). Smatra se da je zastupljenost genetičkih uzroka infertiliteta 15 – 50 % (34, 57).

U ovom istraživanju prevalencija genetičkih uzroka manja je nego u drugim istraživanjima.

U Češkoj je u jednom istraživanju nalaz kariotipizacije otkrio genetičku grešku u 8,15 % slučajeva (61), dok je istraživanje u Hrvatskoj otkrilo kromosomsku abnormalnost kod 18 % parova (62).

U ovom istraživanju kromosomske abnormalnosti nađene su kod 2,3 % osoba s nalazom kariograma, što je manja pojavnost nego u drugim studijama.

U literaturi, učestalost kromosomskih abnormalnosti je 2,2 – 19 % kod infertilnih muškaraca (20, 39) te 14,3 % kod azospermičnih muškaraca (20).

U ovom istraživanju 3 od 138 (2,2 %) muškarca s nalazom kariograma imalo je neku kromosomsku aberaciju, dok je kromosomska aberacija pronađena kod 2 od 11 (18,18 %) azospermičnih muškaraca ($p = 0,004$).

Prema dostupnim podacima iz literature, numeričke abnormalnosti nalaze se kod 2,8 % infertilnih žena, a 2,1 % infertilnih žena nositeljice su strukturnih razmještaja (63).

U ovom istraživanju 1 od 137 (0,73 %) žena imala je numeričku kromosomsku aberaciju, a 2 od 137 žena (1,4 %) imale su strukturnu anomaliju – translokaciju. Pojavnost kromosomskih abnormalnosti kod muškaraca te numeričkih abnormalnosti kod žena u ovom slučaju niža je nego što je zabilježeno u drugim studijama, dok pojavnost strukturnih anomalija dobro korelira s drugim istraživanjima. Moguće je da se numeričke abnormalnosti kao što je trisomija 21 ili Turnerov sindrom češće otkriju u ranijoj dobi te zbog toga nisu uključeni u ispitivanje infertiliteta.

Prema poznatim podacima Klinefelterov sindrom nalazi se kod 0,1 – 0,2 % živorođenih dječaka, a smatra se da se samo 25 % dijagnosticira tijekom života (20, 43, 44). Turnerov sindrom nalazi se u 1 : 2500 živorođenih (49).

U literaturi su zabilježene recipročne translokacije u oko 1 – 1,62 % infertilnih muškaraca (38, 39), a 5 - 20 % infertilnih pacijenata nositelji su translokacije (33, 34). U ovoj studiji dobiveni su rezultati nešto niže pojavnosti; 1,09 % infertilnih pacijenata nositelji su translokacije te 0,7 % infertilnih muškaraca.

Prema jednom istraživanju 10 % infertilnih muškaraca ima terminalnu ili intersticijsku deleciju dugog kraka Y kromosoma (28). U ovom istraživanju 1 od 138 (0,7 %) muškaraca imao je deleciju dugog kraka Y kromosoma.

Prema literaturnim podacima *AZF* delecije nalaze se u 2 – 10 % svih muškaraca (20, 64), *AZFc* delecije nalaze se u 60 %, *AZFb* u 16 % , a *AZFa* deleciju u 15 % slučajeva, kombinirane čine 14 %, a *nonAZF* 5 % (15). Prevalencija mikrolelecija je 3 % u Švedskoj, a 4,5 % u Hrvatskoj (65). Učestalost mikrolelecija Y kromosoma iznosi 0,95 % u Istri (66). U studiji u Češkoj 11,5 % azoospermčnih muškaraca imalo je mikroleleciju *AZF* regije (67).

Od 19 pacijenata u ovom istraživanju kojima su analizirane *AZF* regije, 1 pacijent imao je deleciju (5,2 %). To dobro korelira s drugim nacionalnim istraživanjima.

Analiza mikrolelecija *AZF* regija preporučuje se za muškarce s azoospermijom ili teškom oligozoospermijom s manje od 2 milijuna spermija u mililitru ejakulata (64).

Prema literaturi 64,1 % žena ima barem jednu mutaciju od navedene 3: *MTHFR*, *FVL* ili *PT* (17).

U jednoj hrvatskoj studiji izmjerena je učestalost od 44,74 % heterozigota za *MTHFR* mutaciju i 9,21 % homozigota (68), dok je druga zabilježila 19,8 % *MTHFR* homozigota (69).

U ovom istraživanju zabilježeno je 23 žene s priloženim nalazom analiza mutacija *MTHFR*, *PAI-1*, *FVL* i *PT*. Udio heterozigota iznosi 39,1 %, a homozigota 21,7 %, što je slično navedenim istraživanjima.

Prevalencija nositelja 4G / 4G genotipa za *PAI-1* u Njemačkoj je 29,4 % (70). Ovdje je pojavnost nositelja 4G / 4G genotipa bila 21,7 %, što je blizu rezultatu za njemačku populaciju.

U Europi je učestalost heterozigotnosti za *FVL* mutaciju 5,27 %, u Slovačkoj 4 % (70), a u Hrvatskoj 15,8 % (69). Istraživanje u Sloveniji navodi da je A polimorfizam *PT* gena povezan s nešto većim rizikom tromboze jer je ustanovljen kod 26,7 % trudnica s trombotičkim događajima u trudnoći i 7,5 % u kontrolnoj grupi zdravih trudnica (71).

U ovom istraživanju nije nađen niti jedan nalaz mutacije *FVL* ili protrombinskog polimorfizma.

Mnoga su ograničenja ovoga istraživanja. Većina pacijenata nije obrađena genetičkim testovima, uzorak ispitanika za određen genetički entitet bio je dosta malen, zbog čega se i neki rezultati razlikuju od onih u drugim istraživanjima. Studija je retrospektivna pa se koristila dokumentacija dostupna u medicinskoj dokumentaciji neplodnog para te je količina dokumentacije bila vrlo varijabilna za svakog pacijenta.

Više pacijenata liječeno je ili obrađeno na više Klinika ili čak više bolničkih centara, kao što je KBC Zagreb ili KB Sveti Duh. Neki su liječeni kod privatnog ginekologa, a neki jednostavno nisu imali priložene nalaze pretraga koje su se tražile. Sve je to pridonijelo različitosti količine i vrste nalaza koji su se koristili. Buduće sveobuhvatne prospektivne studije ili studije slučaja i kontrola možda bi dale točnije rezultate. Unatoč tome, čini se da se još uvijek dovoljno ne misli na moguće genetičke poremećaje koji bi mogli bitno pridonositi infertilitetu, ugroziti uspjeh ART-a ili biti uzrokom potomstvu s naslijeđenim malformacijama ili genetičkim poremećajima.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata u ovom istraživanju možemo zaključiti:

1. U desetogodišnjem razdoblju 2006. – 2016. godine u Genetičko savjetovalište KBC-a Osijek javilo se 135 infertilnih parova.

2. Od 135 parova u Genetičkom savjetovalištu, 126 parova i jedan muškarac (93,7 %) obrađen je u Laboratoriju za medicinsku genetiku. Još 11 parova imalo je nalaz kariotipizacije u Laboratoriju za medicinsku genetiku. Sveukupno je nalaz kariotipizacije imalo 275 osoba.

3. Genetički uzrok infertiliteta dokazan je kod 5,81 % pacijenata obrađenih genetičkim testovima, i kod 11,85 % parova iz Genetičkog savjetovališta.

4. Od 16 pacijenata s dokazanim genetičkim uzrokom infertiliteta, 13 (81,2 %) su bile žene, a 3 (18,8 %) su bili muškarci, kod 13 žena utvrđen je: 1 Turnerov sindrom (7,7 %), 2 nositeljice translokacije (15,4 %), 3 *MTHFR* homozigota (23,1 %), 2 *MTHFR* homozigota i istodobne nositeljice 4G / 5G *PAI-1* genotipa (15,4 %) i 5 nositeljica 4G / 4G *PAI-1* genotipa (38,4 %); kod 3 muškarca utvrđen je: 1 Klinefelterov sindrom (33,3 %), 1 terminalna delecija Y kromosoma (33,3 %) i 1 nositelj translokacije (33,3 %).

5. Prevalencija genetičkog uzroka infertiliteta, kromosomskih numeričkih i strukturnih aberacija (translokacija, delecija) kod ukupnih parova, muškaraca i žena zasebno te prevalencija polimorfizama *FVL*-a i *PT* bila je niža od prevalencije zabilježene u drugim nacionalnim i drugim studijama; prevalencija mikrolelecija Y kromosoma te *MTHFR* i *PAI-1* bila je slična prevalenciji u drugim nacionalnim studijama.

7. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Utvrditi broj neplodnih parova koji su se javili u Genetičko savjetovalište KBC-a Osijek, odrediti omjer pacijenata registriranih u savjetovalištu i onih poslanih na kariotipizaciju, odrediti postotak parova s dokazanim genetičkim uzrokom infertiliteta, odrediti pojavnost genetičkih entiteta, usporediti dobivene rezultate s drugim nacionalnim istraživanjima ili zemljama iz okruženja.

Ustroj studije: Istraživanje je retrospektivno.

Ispitanici i metode: Pregled medicinske dokumentacije infertilnih parova obrađenih u KBC-u Osijek i Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Osijek 2006. - 2016. godine.

Rezultati: U KBC-u Osijek ukupno je obrađeno 982 para 2006. – 2016. godine. Iz Ambulante za humanu reprodukciju obrađeno je 857 parova, od kojih je 21 par (2,3 %) imao nalaz kariograma. Broj parova registriranih u Genetičkom savjetovalištu bio je 135. Od toga je 126 parova i 1 muškarac (93,7 %) poslano na kariotipizaciju. Za 275 osoba napravljen je barem jedan genetički test, uključujući kariogram. Genetički uzrok infertiliteta nađen je kod 16 parova: 13 žena i 3 muškarca.

Zaključak: U desetogodišnjem razdoblju u Genetičko savjetovalište KBC-a Osijek javilo se 135 neplodnih parova, 93,7 % poslano je na kariotipizaciju. Sveukupno je nalaz kariograma imalo 275 osoba. Genetički uzrok infertiliteta dokazan je kod 5,81 % pacijenata obrađenih genetičkim testovima, i kod 11,85 % parova iz Genetičkog savjetovališta. Utvrđeni genetički uzroci infertiliteta: Turnerov sindrom, Klinefelterov sindrom, delecija Y kromosoma, nositelji kromosomske translokacije, *MTHFR* homozigoti, *PAI-1* polimorfizmi. Pojavnost mikrolecije Y kromosoma, *MTHFR* i *PAI-1* mutacija bila je slična pojavnosti u drugim studijama. Pojavnost ostalih entiteta bila je niža nego u drugim studijama.

Ključne riječi: infertilitet; kariotipizacija; pobačaj, habitualan.

8. SUMMARY

Genetic causes of infertility in eastern Slavonia

Objectives: The aim of this study was to determine the number of infertile couples registered at Clinical Hospital Center Osijek, to determine the ratio of patients registered and those with karyotype test result, to determine the percentage of couples with identified genetic cause of infertility, to determine the prevalence of genetic entities and to compare these results to other national research results or research results from other countries in the region.

Study design: The research was retrospective.

Material and methods: Analysis of medical documentation of infertile couples registered at Clinical Hospital Center Osijek and Medical faculty Osijek from 2006 to 2016.

Results: There were 982 couples treated at Clinical Hospital Center Osijek. Out of 857 couples at the Clinic for Gynecology and Obstetrics, 21 couples were subjected to karyotyping test analysis. The number of couples registered at Clinic for Genetic Counseling was 135 and 126 couples and 1 man (93.2 %) had a karyotype test result. 275 patients were subjected to at least one genetic test. Genetic cause of infertility was found in 16 patient, or 16 couples: in 13 women and 3 men.

Conclusion: In a ten-year period there were 135 couples registered at Clinic for Genetic Counseling at Clinical Hospital Center Osijek, 93.2 % were subjected to karyotypes test. 275 people had a karyotyping test analysis. Genetic cause of infertility was determined in 5.81 % patients, of those who underwent at least one genetic test and in 11.85 % of couples at Clinic for Genetic Counseling. The following genetic causes contributing to infertility were identified: Turner's syndrome, Klinefelter's syndrome, terminal deletion of the Y chromosome, carriers of chromosomal translocation, *MTHFR* homozygous gene mutations, *PAI-1* polymorphisms. Prevalence of Y chromosome deletions, *MTHFR* and *PAI-1* mutations was similar to prevalence obtained in other studies. Prevalence of remaining genetic entities was found lower in comparison to those in other studies.

Key words: abortion, habitual; infertility; karyotyping.

9. LITERATURA

1. Mascarenhas M, Cheung H, Mathers C, Stevens G. Measuring infertility in populations: constructing a standard definition for use with demographic and reproductive health surveys. *Popul Health Metrics*. 2012;10:1-11.
2. Gurunath S, Pandian Z, Anderson R, Bhattacharya S. Defining infertility--a systematic review of prevalence studies. *Hum Reprod Update*. 2011;17:575-88.
3. WHO. Infecundity, infertility, and childlessness in developing countries. Demographic and Health Surveys (DHS) Comparative reports No. 9. 2004. Dostupno na adresi: <http://www.who.int/entity/reproductivehealth/topics/infertility/DHS-CR9.pdf?ua=1>. Datum pristupa: 03. 06. 2016.
4. Aronson D. Defining infertility. *Public Health Reports*. 2000;115:6
5. Bauman R. Obrada i terapija neplodnosti. *Medicina*. 2009;45:300-12.
6. Šimunić V. Ginekologija. 2. izd. Zagreb: Naklada Ljevak; 2001. str. 349.
7. Gnoth C. Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod*. 2005;20:1144-7.
8. Carp H, Salomon O, Seidman D, Dardik R, Rosenberg N, Inbal A. Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod*. 2002;17:1633-7.
9. Wilkes S, Chinn D, Murdoch A, Rubin G. Epidemiology and management of infertility: a population-based study in UK primary care. *Family Practice*. 2009;26:269-74.
10. Larsen U. Research on infertility: Which definition should we use?. *Fertil and Steril*. 2005;83:846-52.

11. WHO manual for investigation and diagnosis of infertile couple. 1993. Dostupno na adresi: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/58563/1/WHO_BRN_6676_\(part1\).pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/58563/1/WHO_BRN_6676_(part1).pdf). Datum pristupa: 03. 06. 2016.
12. Grunewald S, Paasch U. Basic diagnostics in andrology. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2013;11:799-815.
13. Lindsay TJ, Vitrikas KR. Evaluation and Treatment of Infertility. *Am Fam Physician.* 2015;91:308-14.
14. Bieniek J, Drabovich A, Lo K. Seminal biomarkers for the evaluation of male infertility. *Asian J Androl.* 2016;18:426-33.
15. Shefi S, Turek P. Definition and current evaluation of subfertile men. *Int Braz J Urol.* 2006;32:385-97.
16. Pacey A, Coughlan C, Clarke H, Cutting R, Saxton J, Waite S, i sur. Sperm DNA fragmentation, recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Asian J Androl.* 2015;17:681-5.
17. Karatas A, Eroz R, Albayrak M, Ozlu T, Cakmak B, Keskin F. Evaluation of Chromosomal Abnormalities and Common Trombophilic Mutations in Cases with Recurrent Miscarriage. *Afr Health Sci.* 2014;14:216-22.
18. Hughes E, Grantmyre J, Zini A. An Integrated Approach to Male-Factor Subfertility: Bridging the Gap Between Fertility Specialists Trained in Urology and Gynaecology. *J Obstet Gynaecol Can.* 2015;37:258-65.
19. Keck C. Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. *Hum Reprod Update* 1998;4:891-903.
20. Hotaling J, Carrell D. Clinical genetic testing for male factor infertility: current applications and future directions. *Andrology* 2014;2:339-50.

21. Foresta C, Ferlin A, Gianaroli L, Dallapiccola B. Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. *Eur J Hum Genet.* 2002;10:303-12.
22. Broer S, Broekmans F, Laven J, Fauser B. Anti-Mullerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications. *Hum Reprod Update* 2014;20:688-701.
23. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2012;98:1407-15.
24. Arce J, La Marca A, Mirner Klein B, Nyboe Andersen A, Fleming R. Antimüllerian hormone in gonadotropin releasing-hormone antagonist cycles: prediction of ovarian response and cumulative treatment outcome in good-prognosis patients. *Fertil Steril.* 2013;99:1644-53.
25. Mtiraoui N, Zammiti W, Ghazouani L, Braham N, Saidi S, Finan R, i sur. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses. *Reproduction.* 2006;131:395-401.
26. Fortuño C, Labarta E. Genetics of primary ovarian insufficiency: a review. *J Assist Reprod Genet* 2014;31:1573-85.
27. Pastore L, Johnson J. The FMR1 gene, infertility, and reproductive decision-making: a review. *Front Genet.* 2014;5:1-10.
28. Shah K. The genetic basis of infertility. *Reproduction.* 2003;126:13-25.
29. Zorrilla Myatsenko A. The Genetics of Infertility: Current Status of the Field. *Curr Genet Med Rep.* 2013;1:247-60.
30. Pradhan M, Dalal A, Khan F, Agrawal S. Fertility in men with Down syndrome: a case report. *Fertil Steril.* 2006;86:1765.e1-e3.
31. MacColl G, Bouloux P, Quinton R. Kallmann Syndrome: Adhesion, Afferents, and Anosmia. *Neuron.* 2002;34:675–8.

-
32. Kim S. Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism and Kallmann Syndrome: Past, Present, and Future. *Endocrinol Metab.* 2015;30:456-66.
33. Venkateshwari A, Srilekha A, Veena K, Sujatha M, Jyothy A. A Rare De Novo Balanced X; 1 Translocation in an Indian Female with Primary Amenorrhea. *J Reprod Infertil.* 2015;16:171-3.
34. Huang C, Chang L, Tsai Y, Hung C, Fang M, Su Y, i sur. A feasible strategy of preimplantation genetic diagnosis for carriers with chromosomal translocation: Using blastocyst biopsy and array comparative genomic hybridization. *J Formos Med Assoc.* 2013;112:537-44.
35. Pylyp L, Zukin V, Bilko N. Chromosomal segregation in sperm of Robertsonian translocation carriers. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30:1141-5.
36. Vozdova M, Oracova E, Kasikova K, Prinosilova P, Rybar R, Horinova V, i sur. Balanced chromosomal translocations in men: relationships among semen parameters, chromatin integrity, sperm meiotic segregation and aneuploidy. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30:391-405.
37. Baccetti B. Ultrastructural studies of spermatozoa from infertile males with Robertsonian translocations and 18, X, Y aneuploidies. *Hum Reprod.* 2005;20:2295-300.
38. Zhang H, Wang R, Li L, Sun W, Zhang H, Liu R. Male carriers of balanced reciprocal translocations in Northeast China: sperm count, reproductive performance, and genetic counseling. *Genet Mol Res.* 2015;14:18792-8.
39. Kara M, Sen A, Sakallı Cetin E, Kargun K. Chromosomal Translocation t (10;19) (q11.2;q13.4) in an Infertile Male. *Eurasian J Med.* 2014;46:220-3.
40. Meduri G, Bachelot A, Cocca M, Vasseur C, Rodien P, Kuttenn F, i sur. Molecular pathology of the FSH receptor: New insights into FSH physiology. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;282:130-42.

-
41. Huhtaniemi I. The Parkes lecture. Mutations of gonadotrophin and gonadotrophin receptor genes: what do they teach us about reproductive physiology?. *Reproduction*. 2000;119:173-86.
 42. Niederberger C. The Prevalence of Chromosomal Abnormalities in Subgroups of Infertile Men. *J Urol*. 2012;188:911-2.
 43. Bojesen A, Groth K, Høst C, Skakkebjerg A. The role of hypogonadism in Klinefelter Syndrome. *Asian J Androl*. 2014;16:185-91.
 44. Nieschlag E. Klinefelter Syndrome. *Dtsch Arztebl Int*. 2013;110:347–53.
 45. Testicular function and fertility in men with Klinefelter syndrome: a review. *Eur J Endocrinol*. 2013;168:67–76.
 46. Miyamoto T, Minase G, Okabe K, Ueda H, Sengoku K. Male infertility and its genetic causes. *J Obstet Gynaecol Res*. 2015;41:1501-5.
 47. Peng D, Zhang Y, Zhang X, Hu C, Liu M, Liu R. An infertile 45,X male with a SRY-bearing chromosome 13: a clinical case report and literature review. *J Assist Reprod Genet*. 2014;32:107-9.
 48. Doger E, Çakıroğlu Y, Ceylan Y, Ulak E, Özdamar Ö, Çalışkan E. Reproductive and obstetric outcomes in mosaic Turner's Syndrome: a cross-sectional study and review of the literature. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;13:1-7.
 49. Oktay K, Bedoschi G, Berkowitz K, Bronson R, Kashani B, McGovern P, i sur.. Fertility Preservation in Women with Turner Syndrome: A Comprehensive Review and Practical Guidelines. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2015;15:1-8.
 50. Tartaglia N, Howell S, Sutherland A, Wilson R, Wilson L. A review of trisomy X (47,XXX). *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:1-9.
 51. Phelan N, Williams E, Cardamone S, Lee M, Creighton S, Rumsby G, i sur. Screening for mutations in 17 -hydroxysteroid dehydrogenase and androgen receptor in women presenting

- with partially virilised 46,XY disorders of sex development. *Eur Journal Endocrinol.* 2015;172:745-51.
52. Voorhuis M, Onland-Moret N, Fauser B, Ploos van Amstel H, van der Schouw Y, Broekmans F. The association of CGG repeats in the FMR1 gene and timing of natural menopause. *Hum Reprod.* 2012;28:496-501.
53. Foka Z. Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod.* 2000;15:458-62.
54. Yalcintepe S, Ozdemir O, Hacivelioglu SO, Akurut C, Koc E, Uludag A, i sur. Multiple Inherited Thrombophilic Gene Polymorphisms in Spontaneous Abortions in Turkish Population. *Int J Mol Cell Med.* 2015;4:120-7.
55. Seguí R, Estellés A, Mira Y, España F, Villa P, Falcó C, i sur. PAI-1 promoter 4G/5G genotype as an additional risk factor for venous thrombosis in subjects with genetic thrombophilic defects. *Br J Haematol.* 2008;111:122-8.
56. Divella R, Daniele A, Abbate I, Savino E, Casamassima P, Sciortino G, i sur. Circulating Levels of PAI-1 and SERPINE1 4G/4G Polymorphism Are Predictive of Poor Prognosis in HCC Patients Undergoing TACE. *Transl Oncol.* 2015;8:273-8.
57. Liu Y. Meta-Analysis of the Association between Plasminogen Activator Inhibitor-1 4G/5G Polymorphism and Recurrent Pregnancy Loss. *Med Sci Monit.* 2015;21:1051-6.
58. Kolčić I, Vorko Jović A. *Epidemiologija.* 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
59. Marušić M. *Uvod u znanstveni rad u medicini.* 4.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
60. Barišić I. Genetičko savjetovanje - stajalište Hrvatskog društva za humanu genetiku liječničkog zbora. *Paediatrica Croatica.* 2010;54:213-6.

-
61. Mejsnar J, Mejsnarova B, Baxova A, Mayer Z, Gregor V. Cooperation between genetic counseling centers, cytogenetic laboratories and in vitro fertilization centers in the treatment of reproductive disorders. *Cas Lek Cesk.* 2000;8:246-8.
62. Radojčić Banovinac A, Buretić-Tomljanovac A, Starčević N, Kapović M, Vlaselić I, Randić L. Chromosome Studies in Patients with Defective Reproductive Success. *Am J Reprod Immunol.* 2000;5:279-83.
63. Stipoljev F. Genetski uzroci neplodnosti. *Medicina* 2007;43:279-84.
64. Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tüttelmann F. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology.* 2013;2:5-19.
65. Sertić J, Cvitković P, Myers A, Randall K, Saiki RK, Stavljenić-Rukavina A. Genetic Markers of Male Infertility: Y Chromosome Microdeletions and Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Gene Mutations. *Croat Med J.* 2001;42:416-20.
66. Medica I, Gligorievska N, Prenc M, Peterlin B. Y microdeletions in the Istria county, Croatia. *Asian J Androl.* 2005;7:213-6.
67. Sobczyńska-Tomaszewska A1, Bak D, Wolski JK, Bablok L, Nawara M, Mazurczak T, i sur. Molecular analysis of defects in the CFTR gene and AZF locus of the Y chromosome in male infertility. *J Reprod Med.* 2006;51:120-7.
68. Lovričević I, Franjić BD, Tomićić M, Vrkić N, De Syo D, Hudorović N, i sur. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677 C --> T genetic polymorphism in 228 Croatian volunteers. *Coll Antropol.* 2004;28:647-54.
69. Lenz B, Samardžija M, Drenjančević D, Zibar D, Milostić-Srb A. The investigation of hereditary and acquired thrombophilia risk factors in the development of complications in pregnancy in Croatian women. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29:264-9.

70. Kvasnička T, Hajkova J, Bobčikovaj P, Čerhova V, Malikova I, Ulrych J, i sur. The Frequencies of Six Important Thrombophilic Mutations in a Population of the Czech Republic. *Physiol. Res.* 2014;63:245-53.
71. Meglič L, Stegnar M, Milanez T, Božič M, Peterlin B, Peternel P, i sur. Factor V Leiden, prothrombin 20210G → A, methylenetetrahydrofolate reductase 677C → T and plasminogen activator inhibitor 4G/5G polymorphism in women with pregnancy-related venous thromboembolism. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 2003;111:157-63.

10. ŽIVOTOPIS

Tea Ivanković

Medicinski fakultet Osijek

J. Huttlera 4, 31000 Osijek

tivankovic@mefos.hr

Datum i mjesto rođenja:

2. siječnja, 1992.

Essen, SR Njemačka

Kućna adresa:

Jakoba Užarevića 10, 31208, Petrijevci

tel: +385977959047

ivankovic.tea.1@gmail.com

OBRAZOVANJE:

od 2010.: Studij Medicine, Medicinski fakultet Osijek,

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

od 2006. do 2010.: Isusovačka klasična gimnazija s pravom javnosti u Osijeku

od 1998. do 2006.: Osnovna škola Petrijevci